动 物 学 研 究　1993, 14 (2): 197—198

Zoological Research

ISSN 0254-5853

CN 53-1040 / Q

一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法

AN IMPROVED METHOD FOR ISOLATION OF ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA

王文，施立明

关键词：mtDNA，碱变性提取法

Key words: mtDNA, Isolation by Alkaline Lysis

线粒体 DNA (mtDNA) 已被广泛用于动物群体遗传学和进化生物学的研究，并取得了许多有意义的结果。有效的 mtDNA 提取方法无疑是开展这方面研究的前提。关于动物 mtDNA 的提取方法，国内外已有不少报导。概括起来，可分为：1) 氯化铯超速离心法，2) 柱层析法，3) DNase 法，4) 碱变性法。本文报道了一种改进的碱变性提取法，与其它方法相比，具有应用范围广、简便、经济等优点。

材料和方法　一、材料　本文以银额果蝇 (*Drosophila albomicans*) 成虫及鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、牛蛙 (*Rana catesbeiana*)、鹌鹑 (*Coturnix coturnix*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 的肝脏以及人的胎盘为实验材料，有新鲜的材料，也有液氮长期冻存 (−196℃)、普通冰箱结冻室保存 (−10℃) 或以冰壶 (4℃) 短期内运送至实验室的材料。

二、溶液　SE 缓冲液或称匀浆缓冲液：0.25 M 蔗糖，30 mM Tris-HCl，10 mM Na_2 EDTA，2.5 mM $CaCl_2$，pH 7.3–8.1。

溶液 I：TEN：10 mMTris-HCl，10 mM Na_2 ED TA，0.15 M NaCl，pH 8.0；

或 GTE：1%葡萄糖，25 mM Tris-HCl，50 mM Na_2EDTA，pH 8.0。

溶液 II：1%SDS 含 0.2 N NaOH (用时用 10%SDS 和 1N NaOH 新配制)。

溶液 III：KAc 溶液，其中含 3MK，5 M Ac。

三、操作程序　1. 取 2—15 g (视动物种类而定) 动物组织或整体于少量 SE 液中剪碎 (或研磨碎)，加约 50 ml SE，以电动匀浆器 1500 r / min 上下匀浆 15 次 (有硬质的组织剪碎后先用纱布过滤，再用匀浆器匀浆)。将匀浆物 1000 r / min 离心 10 min 取上清液 12000 r / min 离心 15 min，沉淀即为线粒体。加 4 ml SE 液悬浮线粒体，然后转至 4 个 1.5 ml Eppendorf 管，每管 1 ml。

2. 12000r / min 离心 8 min，弃上清液。每管加 150 μl 溶液，将沉淀吹打均匀后加 300 μl 新制的溶液 II，混匀。冰浴 10 min，各加 225 μl 冷溶液 III (4℃)，混匀。冰浴 25 min。

3. 12000 r / min 离心 6 min，取上清液，加入半倍体积的水饱和酚，室温振荡 15 min 后，加原上清液 1 / 2 体积的氯仿—异戊醇 (24: 1)，充分混匀。

本文 1992 年 5 月 29 日收到，同年 9 月 3 日修回。

4. 12000r / min 离心 8min，取水相，加等体积异丙醇或两倍体积无水乙醇混匀冰浴 30 min。12000r / min 离心 10min。用 70%冷乙醇（0℃）洗涤沉淀。12000r / min 离心 2 min。空或自然干燥，加适量体积 TE（其中可含 20μg / mlDNase-free 的 RNase A）溶解。

四、 **酶解和检测** 按照常规的 DNA 酶解和检测方法进行。

结果与讨论 依照本法提取的各类动物的 mtDNA 酶切电泳图谱见图 1。果蝇成虫的 mtDNA 得率最高，约为 1.5-2.0μg / g。鲤鱼、鹌鹑、鼠兔和牛蛙的肝脏约为 1.0μg / g。人胎盘得率约为 0.5μg / g。如用 RNase 处理,可完全消除 RNA 的干扰（图 1. 鲤鱼和果蝇）。结合本实验室的其它工作，看来，本方法对于昆虫、鱼类、两栖类、鸟类以及哺乳类的各种组织均可获得满意的结果。

本法与 Tamura 等（1988）的方法基本相似，但作了几点重要改进。

一、匀浆液的 pH 值有一个变动范围（7.3—8.1）而非固定的 7.5。一般而言，在 pH7.3—8.1 范围内，对于大多数动物材料来说都能得到质量较好的 mtDNA。但是有时有的动物却需要 pH 值偏高或偏低的 SE 液。例如，在 pH7.5 时，即便是新鲜的牛蛙材料提取的 mtDNA 也受到较严重的核 DNA 污染（图 1. 牛蛙$_1$）；而在 pH8.1 时，即使从冰箱冻存材料提取的 mtDNA 核 DNA 污染也较少（图 1 牛蛙$_3$）。根据我们的体会，在试验某一新的材料时，先用 pH7.6 的 SE 液,如提取的 mtDNA 样品电泳检测后背景不清晰，就改用 pH 值偏高的 SE 液；如无 DNA 而只有 RNA，就改用 pH 值偏低一些的 SE 液。

二、我们提出溶液 I 的两种配方，以供具体应用时选择。采用 GTE 得率较高,但对于某些材料，提取的 mtDNA 会有核 DNA 污染。此时，改用 TEN 则可提高样品的质量。如图 1 中牛蛙$_2$ 和牛蛙$_3$，都是用冻存牛蛙肝提取的样品，但在提取过程中，牛蛙$_2$ 用的溶液 I 是 GTE，而牛蛙$_3$ 是 TEN。很明显，牛蛙$_3$ 背景比牛蛙$_2$ 清晰。

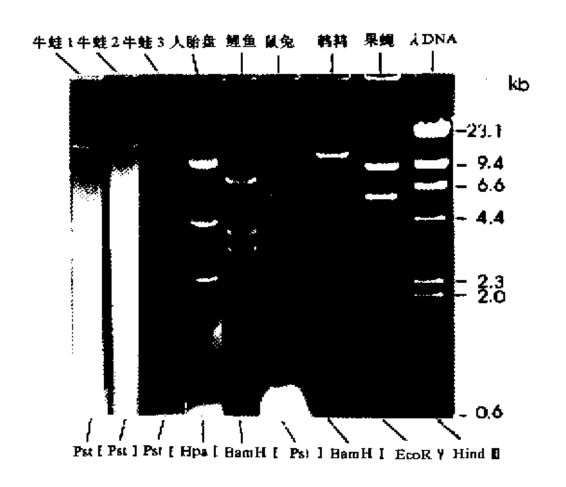


图 1 各种 mtDNA 酶切电泳图谱

Fig. 1 Electropheresis patterns of digestions of mtDNA extracted from different animals

上端文字指明相应列 DNA 的来源。下端文字表示相应列所用的限制性内切酶。牛蛙$_1$ 和牛蛙$_2$ 是对照，用以说明 SE 液的 pH 值和不同配方的溶液 I 对 mtDNA 样品质量的影响。鲤鱼和果蝇用 RNase A 处理过。λ DNA

三、本法不需要严格的低温操作。除了复性时（步骤 7）要求冰浴外，其它步骤均可在室温操作。

总之，我们改进的 mtDNA 提取方法简便、快速、适用范围广，对设备和试剂的要求都不高，而得率和纯度都可满足 mtDNA 片段长度多态性分析的要求，不失为一值得试用的 mtDNA 提取新方法。

王 文 施立明
Wang Wen Shi Liming
（中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室，昆明 650223）
(*Laboratory of Celluar and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)